

Molekuláris faj-diverzitás vizsgáló módszerek fajkompozíció torzításának elemzése, optimális eljárás kidolgozása és gyakorlati alkalmazása

1. Bevezetés

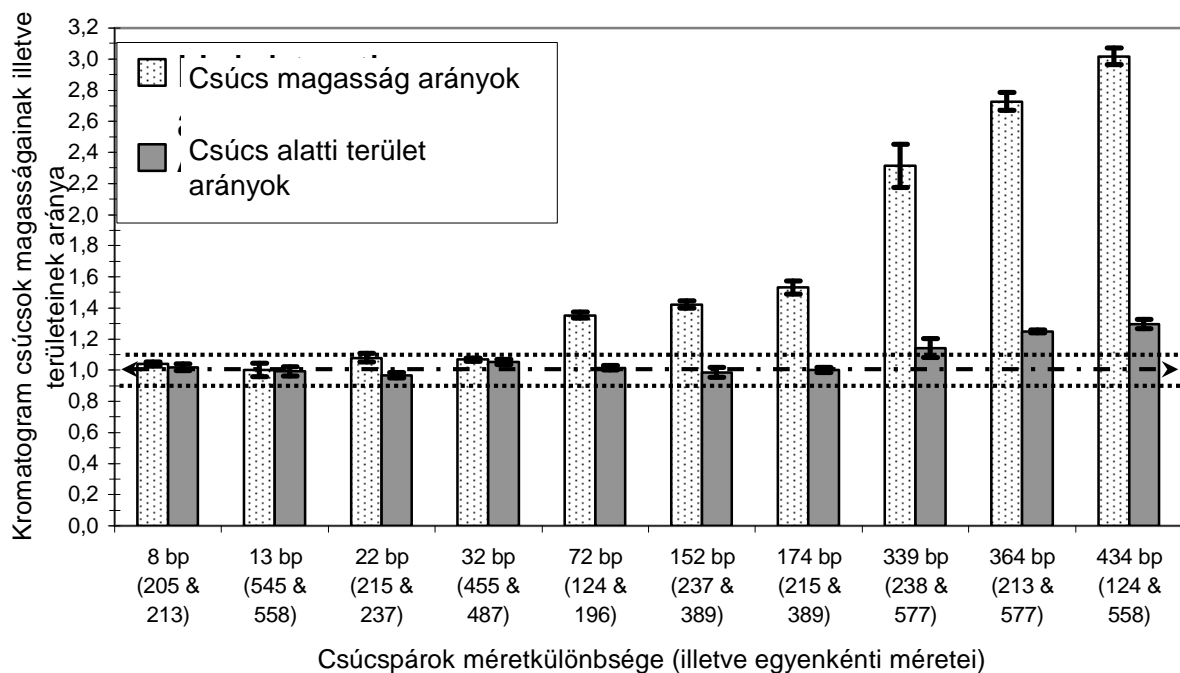
A modern környezeti mikrobiológia eszköztára jelentős részben DNS illetve RNS alapú vizsgálati módszerekből áll. A közösségek összetételéről és szerkezetéről levont következtetések feltételezik, hogy a vizsgálati lépések (nukleinsav izolálás, amplifikáció polimeráz láncreakcióval, PCR termékek elválasztása és detektálása - pl. klónkönyvtárak készítése) során a mintában lévő faj-abundancia viszonyok nem változnak lényegesen, azonban a módszertani kutatások ennek ellenkezőjét sugallják. Kutatásunk a multitemplát PCR illetve a klónkönyvtár készítés közösségszerkezeti képet torzító hatásait igyekezett az eddigieknél alaposabban feltérképezni

2. A multitemplát PCR közösségszerkezet torzító hatásai

A multitemplát PCR során az „univerzális” PCR primerek taxononként eltérő erősségű bekötődése miatti torzítás lehetőségét többen felvetették, de a jelenség hátterét, a PCR paraméterekkel való összefüggéseit nem vizsgálták meg részletesebben (Polz & Cavanaugh, 1998, Lueders & Friedrich, 2003, Reysenbach *et al.*, 1992). Kutatásunk során három lényegesnek ítélt paraméter: a primer illeszkedési hibák, az annealációs hőmérséklet, és a PCR ciklusszám közösségszerkezeti képre gyakorolt hatását vizsgáltuk statisztikai elemzést is megengedő részletességgel, két univerzális forward és egy reverz primer (27F (Lane, 1991), 63F (Marchesi *et al.*, 1998) és 1387R (Marchesi *et al.*, 1998)) felhasználásával, ismert genomi tulajdonságokkal bíró baktériumtörzsekből alkotott modellrendszerben. Deketálási módszernek a szemikvantitatív terminális restrikciós fragmenthossz analízist (Terminal Restriction Fragment Length Polimorphism, T-RFLP) választottuk, s ennek kapilláris elektroforetikus elválasztással való kombinációjában is szereztünk módszertani tapasztalatokat. A kísérleteket természetes közösségi mintákra is kiterjesztettük, valós helyzetben mutatva meg ezzel a PCR paramétereknek a közösségszerkezeti kép torzulásaira gyakorolt hatását.

2.1. A kapilláris-elektroforetikus elválasztás hatásai PCR termékek relatív mennyiségi viszonyainak meghatározásában

A PCR termékek relatív mennyiségi viszonyainak meghatározásához alkalmazott kapilláris elektroforézis és fluoreszcens detektálás reprodukálhatóságát 1:1 arányú PCR termék keverékek ötféle restrikciós endonukleázzal nyert hasított termékeinek felhasználásával ellenőriztük. A T-RFLP kromatogramok csúcs alatti területeinek arányai az esetek túlnyomó részében jól tükrözték az eredetileg beállított 1:1 arányt, szórásuk alacsony volt (1.ábra). Ellenben a csúcsok magasságának arányai erősen eltértek a várt értéktől, amennyiben a terminális hasítási fragmentumok (TRFek) méretkülönbsége meghaladta az 50 bázispárt. Ezért a kapilláris T-RFLP analízis alkalmazásánál a csúcsok alatti területek nagyságát célszerű figyelembe venni relatív mennyiségi következtetések levonásánál.



1.ábra. A különböző méretű és méretkülönbségű TRF csúcspárok magasság illetve terület arányai. Az arányok számításánál mindig a rövidebb hasítási termék értékeit osztottuk el a hosszabbéval. Az ábrázolt értékek 3 független kísérlet átlagai, az elméletileg várt 1:1-es arányt a szaggatott vonal jelöli.

2.2. A primerek illeszkedési hibáinak hatása a PCR hatékonyságára

A primer illeszkedési hibákat két széles körben használt forward primer alkalmazásával vizsgáltuk, melyek közül a 27F mind a négy felhasznált baktériumtörzs primerkötő helyeihez tökéletesen illeszkedett, míg a 63F a *Bacillus* törzsek esetében három illeszkedési hibát adott (1.táblázat).

TET-27F-primer	5'	A	G	A	G	T	T	T	G	A	T	C	M	T	G	G	C	T	C	A	G	3'
<i>A. hydrophila</i>	5'	A	G	A	G	T	T	T	G	A	T	C	C	T	G	G	C	T	C	A	G	3'
<i>B. cereus</i>	5'	A	G	A	G	T	T	T	G	A	T	C	C	T	G	G	C	T	C	A	G	3'
<i>B. subtilis</i>	5'	A	G	A	G	T	T	T	G	A	T	C	C	T	G	G	C	T	C	A	G	3'
<i>P. fluorescens</i>	5'	A	G	A	G	T	T	T	G	A	T	C	C	T	G	G	C	T	C	A	G	3'

TET-63F-primer	5'	C	A	G	G	C	C	T	A	A	C	A	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C	3'
<i>A. hydrophila</i>	5'	C	A	G	G	C	C	T	A	A	C	A	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C	3'
<i>B. cereus</i> ^a	5'	C	G	T	G	C	C	T	A	A	T	A	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C	3'
<i>B. subtilis</i>	5'	C	G	T	G	C	C	T	A	A	T	A	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C	3'
<i>P. fluorescens</i>	5'	C	A	G	G	C	C	T	A	A	C	A	C	A	T	G	C	A	A	G	T	C	3'

1387R primer	3'	C	G	G	A	A	C	A	T	G	T	G	W	G	G	C	G	G	G	5'
<i>A. hydrophila</i>	5'	G	C	C	T	T	G	T	A	C	A	C	A	C	C	G	C	C	C	3'
<i>B. cereus</i>	5'	G	C	C	T	T	G	T	A	C	A	C	A	C	C	G	C	C	C	3'
<i>B. subtilis</i>	5'	G	C	C	T	T	G	T	A	C	A	C	A	C	C	G	C	C	C	3'
<i>P. fluorescens</i>	5'	G	C	C	T	T	G	T	A	C	A	C	A	C	C	G	C	C	C	3'

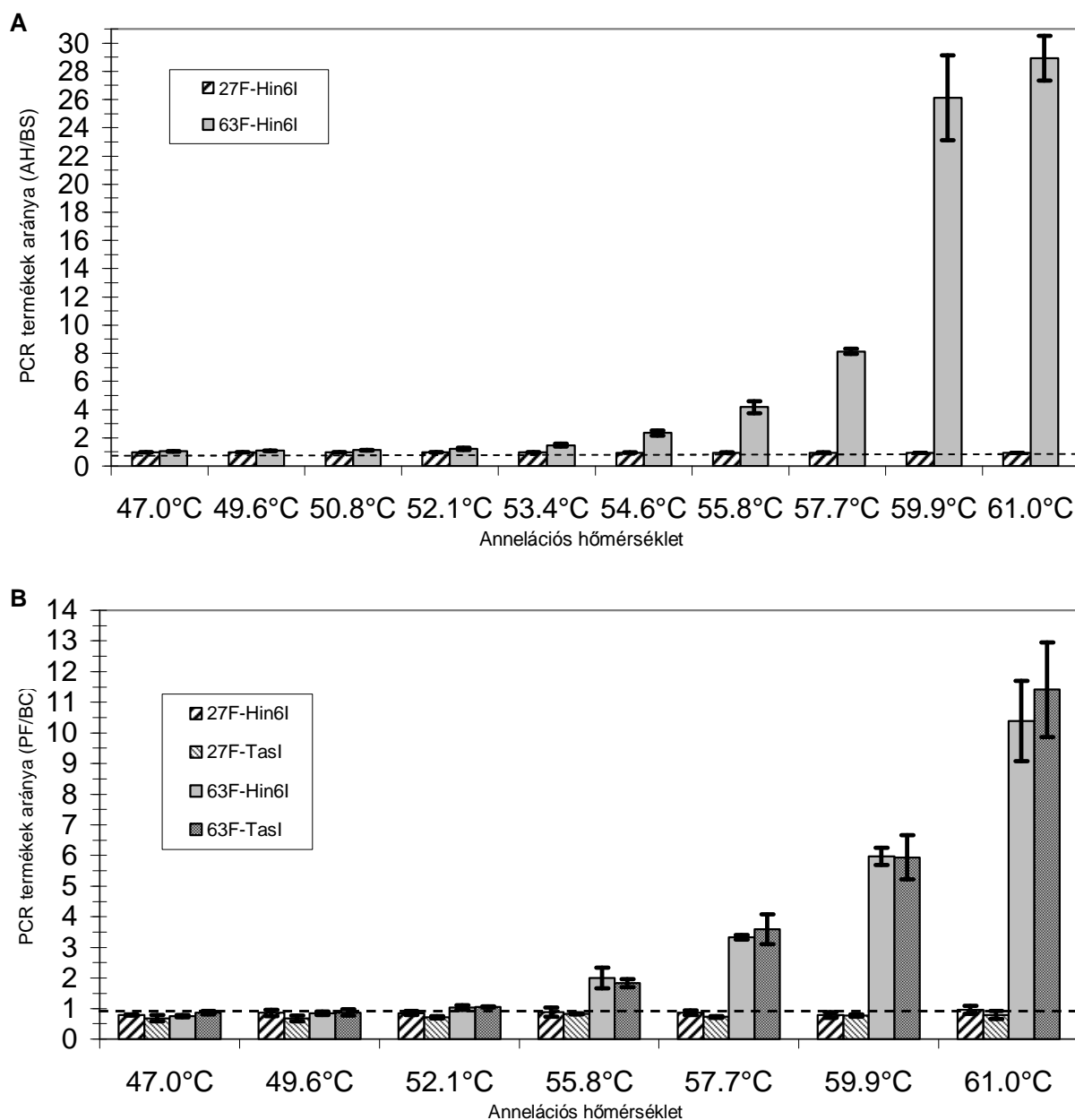
1.táblázat. Az "univerzális" 16S rDNS primerek (27F, 63F és 1387R) illeszkedése a felhasznált törzsek primerkötő helyeivel

^aA szürkével kiemelt betűk azt a három pozíciót jelölik, ahol a 63F primer nem illeszkedik a *Bacillus cereus* és *Bacillus subtilis* törzsek primerkötő helyeihez. A 27F és 1387R primerek mind a négy törzshöz tökéletesen illeszkednek.

A primer illeszkedési hibák hatásának kimutatásához törzspárok genomi DNSének 1:1 koncentrációarányú keverékeit amplifikáltuk 27F-1387R illetve 63F-1387R primerpárokkal. Várakozásainknak megfelelően az *A. hydrophila* (továbbiakban AH) és a *P. fluorescens* (PF) törzsek preferenciálisan amplifikálódtak a *Bacillus* (BC és BS) törzsek mellett 63F primer alkalmazása esetén, míg a 27F nem mutatott ilyen aránytorzítást. Amennyiben a *Bacillus* templátot kisebb arányban (1:10) adtuk a reakcióhoz a PCR előtt, a PCR termékben egyáltalán nem jelent meg, ami azt jelenti, hogy környezeti minták vizsgálatánál komplex közösségek bizonyos tagjai mások preferenciális amplifikációja miatt kieshetnek a detektálható körből.

2.3. Az annealációs hőmérséklet hatása a preferenciális amplifikációra

Az annealációs hőmérséklet preferenciális amplifikációra gyakorolt hatását széles skálán, 47°C- tól 61°C-ig vizsgáltuk. Az AH és BS törzsek genomi DNSének 1:1 arányú keverékét 27F- illetve 63F-1387R primerpárokkal amplifikálva a 2.A.ábrán látható eredményeket kaptuk. A kromatogramon egymástól 25 bázispárra eső TRF csúcsok 5%-os hibahatáron belüli detektálást tettek lehetővé (1.ábra). 63F-1387R primerpár alkalmazása esetén a beállított 1:1 aránytól való eltérés az annealációs hőmérséklet emelkedésével közel exponenciálisan nőtt. Alacsony annealációs hőmérsékleteken illetve 27F-1387R primerpár alkalmazásával az arányok nem torzultak a PCR során. A PF illetve BC törzspárral végzett kísérletek alátámasztották ezt az eredményt (2.B.ábra).



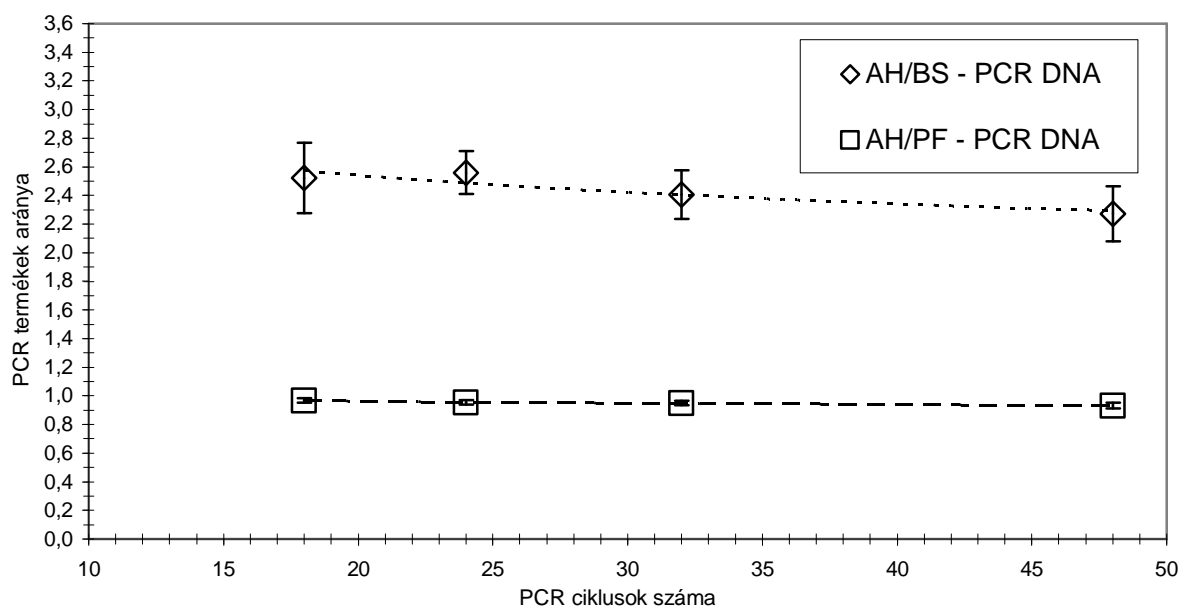
2.ábra.

A) *Aeromonas hydrophila* (AH) és *Bacillus subtilis* (BS) TRF csúcsok területarányai különböző annelációs hőmérsékletek esetében. Minden esetben az AH TRF terület értékét osztottuk el a BS értékével. Az ábrázolt értékek 3 független kísérlet átlagai.

B) *Pseudomonas fluorescens* (PF) és *Bacillus cereus* (BC) TRF csúcsok területarányai különböző annelációs hőmérsékletek esetében. Minden esetben az PF TRF terület értékét osztottuk el a BC értékével. Az ábrázolt értékek 3 független kísérlet átlagai.

2.4. A PCR ciklusszámának hatása a preferenciális amplifikációra

A PCR ciklusszámának hatását az AH+PF (tökéletes illeszkedések a 63F primerrel) és az AH+BS (BS esetében tökéletlen illeszkedés) törzspárok segítségével vizsgáltuk. Hogy az eltérő genomi tulajdonságok (operonszám, genom méret) zavaró hatásait kiküszöböljük, 27F-1492R primerekkel készített tisztított PCR termékek 1:1 koncentráció arányú keverékeit amplifikáltuk 63F-1378R primerpárral 54°C annelációs hőmérséklettel. A reakciókat 18, 24, 32 illetve 48 ciklus után állítottuk le. Mint a 3.ábra is mutatja, a ciklusszám növekedésével csak egészen enyhe mértékben csökken a primer mismatch által okozott aránytorzulás.



3.ábra. A PCR ciklusszámának hatása AH és BS illetve AH és PF PCR termék keverékek amplifikálása esetén. Az ábrázolt értékek 3 független kísérlet átlagai.

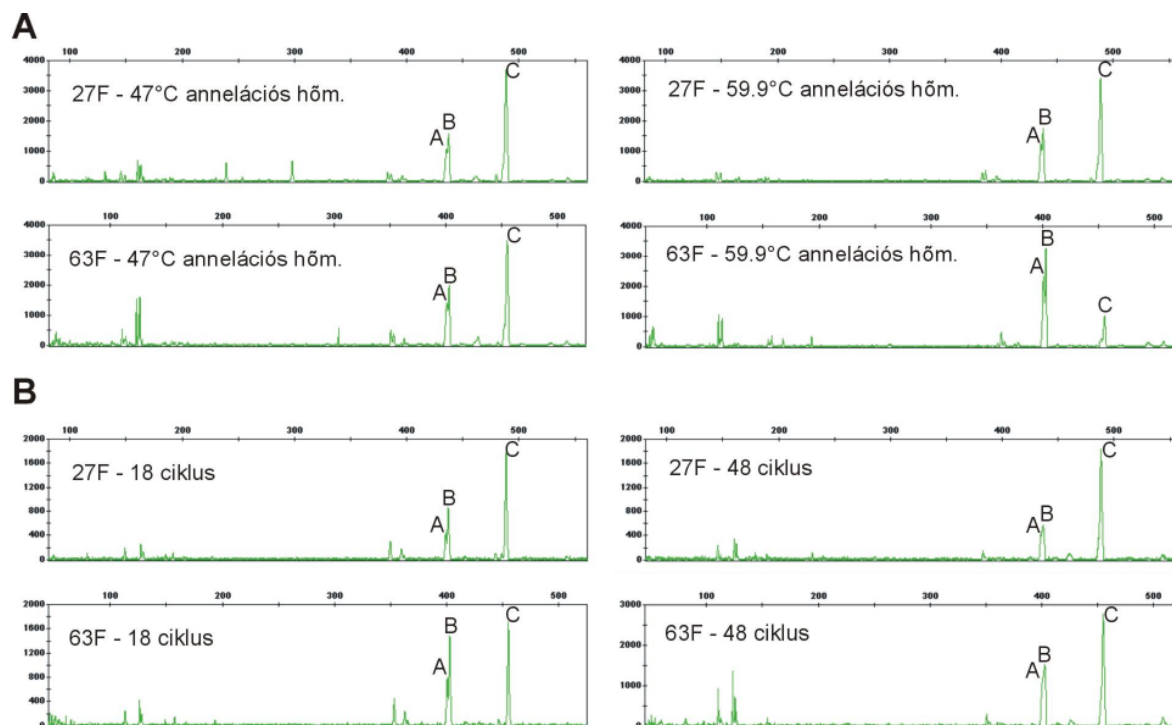
2.5. Környezeti minták vizsgálatánál tapasztalható hatások

Az egyszerű modellkísérletek eredményei azt sugallták, hogy komplex közösségeket tartalmazó környezeti minták feldolgozásánál az annelációs hőmérsékletet érdemes alacsonyan tartani, elkerülendő az egyes csoportok preferenciális amplifikációja miatti közösség szerkezet torzulást, illetve diverzitás veszteséget. Hipotézisünket gyékény rhizoplán baktériumközösségek T-RFLP analízisével teszteltük, 63F- illetve 27F-1387R primerpárokkal, kétféle annelációs hőmérséklettel (2.táblázat). A TRFek nagyrésze mindkét primerpár esetében detektálható volt, bár mind a két primerpár előhozott csak rá jellemző csúcsokat (4.ábra.).

Primer szett	Annelációs hőmérséklet	Ciklusszám	Csúcsok száma	Shannon index (H)	(A+B)/C ^a
27F	47.0 °C	32	71.5±14.8	1.19±0.06	0.57±0.02
27F	50.9 °C	32	65.0±7.1	1.06±0.04	0.56±0.02
27F	55.3 °C	32	58.0±1.4	0.99±0.01	0.60±0.03
27F	59.9 °C	32	49.0±5.7	0.94±0.01	0.67±0.04
63F	47.0 °C	32	83.0±1.4	1.31±0.01	0.71±0.01
63F	50.9 °C	32	75.5±13.4	1.21±0.08	0.78±0.04
63F	55.3 °C	32	72.5±8.7	1.17±0.03	1.38±0.13
63F	59.9 °C	32	70.7±4.0	1.34±0.05	3.89±0.19
27F	52.0 °C	18	19.0±2.6	0.89±0.02	0.73±0.02
27F	52.0 °C	24	22.0±1.4	0.93±0.00	0.82±0.02
27F	52.0 °C	32	24.7±5.5	0.87±0.05	0.67±0.01
27F	52.0 °C	48	30.7±7.8	0.91±0.07	0.55±0.04
63F	52.0 °C	18	30.0±1.7	1.04±0.02	1.26±0.02
63F	52.0 °C	24	26.8±4.3	1.02±0.02	1.40±0.06
63F	52.0 °C	32	33.0±2.1	1.07±0.03	1.03±0.05
63F	52.0 °C	48	26.5±0.7	1.03±0.03	0.83±0.03

2.táblázat. rhizoplán minták T-RFLP analízise

^a A 4. ábrán betűkkel jelölt csúcsok terület arányai. Az A és B csúcsok területeit az egyszerűség kedvéért összeadtuk, mivel 48 ciklus esetén nem váltak el tökéletesen a kromatogramon.



4. ábra Különböző PCR paraméterek hatása rhizoplán baktériumközösségek T-RFLP analízisén keresztül bemutatva. A szövegben említett TRF csúcsokat A, B és C betűvel jelöltük.

A) Az annealációs hőmérséklet hatása a T-RFLP mintázatra.

B) A ciklusszám hatása T-RFLP mintázatra.

A magasabb annealációs hőmérséklet mindkét primerpár esetében kevesebb TRF csúcsot eredményezett, alábecsülve így a közösség diverzitását (2. táblázat). Ez szemben áll Osborn és munkatársai (2000) eredményeivel, akik a TRFek számának emelkedését tapasztalták az annealációs hőmérséklet emelkedésével. Lehetséges, hogy ezt az általuk alkalmazott poliakrilamid gélelektroforézisnél a betöltött mintamennyiségek egyenlőtlenségei okozták – esetünkben a kapilláris elektroforézis és az automatikus injektálás miatt ez a hibaforrás kizárható.

Azon túl, hogy kisebb annealációs hőmérsékleten több csúcs jelent meg a TRFLP kromatogramokban, a csúcsok alatti területek relatív nagysága is szembetűnően megváltozott (lásd az A, B és C csúcsokat a 4.A. ábrán). A 27F primer használata esetén az annealációs hőmérséklet emelésével a csúcsok arányai nem változtak jelentősen, ellenben 63F primerrel a C csúcs a magasabb hőmérsékleten jelentősen veszített dominanciájából. A Shannon féle diverzitás indexek mindkét primerpár esetén enyhén csökkentek az annealációs hőmérséklet emelésével, bár a 63F 59,9°C-n enyhén nagyobb értéket hozott – ez valószínűleg a C csúcs jelentős dominancia csökkenésének tudható be. A környezeti mintákon végzett vizsgálatok alátámasztották a modellközösségekkel kapott eredményeket, bizonyítva, hogy az annealációs hőmérséklet emelésével a detektálható diverzitás csökken.

A PCR ciklusszámának hatásait szintén teszteltük környezeti mintákon is (4.B. ábra, 2. táblázat). 27F primer használata esetén a ciklusszám emelésével enyhe emelkedést tapasztaltunk a TRF csúcsok számában, a 63F primerrel ez a jelenség nem volt tapasztalható. Másrészt viszont a Shannon indexek nem változtak egyik primerpár esetében sem, szemben

Osborn és munkatársai (2000) eredményeivel. Ez azt a nézetet támasztja alá, hogy a diverzitás indexek a csúcsok számánál jobb fokmérői a komplex mikrobiális közösségek diverzitásának molekuláris ujjlenyomat technikák alkalmazása esetén (Saikaly *et al.*, 2005, Loisel *et al.*, 2006).

Elmondható tehát, hogy a PCR ciklusszámának befolyása nem jelentős komplex környezeti minták diverzitás vizsgálata esetén. Azonban az indokolatlanul magas ciklusszámok használata nem ajánlott, a PCR melléktermékek – kimérák (Wang & Wang, 1997), heteroduplexek és egyszálú DNSek (Jensen & Straus, 1993) – felszaporodása miatt (Qiu *et al.*, 2001).

2.6. Konklúziók

Miután a minden taxonómiai csoport esetében tökéletesen illeszkedő univerzális 16S primer tervezése megoldhatatlan (Forney *et al.*, 2004), így a primer illeszkedési hibákból következő preferenciális amplifikáció jelenségének jobb megismerése elengedhetetlen. Az újonnan tervezett doménspecifikus primereket általában a PCR hatékonyságára, illetve hozamára nézve tesztelik tiszta törzsek DNS izolátumain illetve környezeti mintákon (Marchesi *et al.*, 1998, Baker *et al.*, 2003), ám emellett a preferenciális amplifikációra nézve is érdemes lenne kivizsgálni ezeket. A közösségi minták analízisének a PCR optimalizációt általában az amplifikáció specificitásának növelése irányába viszik az annealációs hőmérséklet emelésével (Hansen *et al.*, 1998), illetve „touch-down” protokollok alkalmazásával (Simpson *et al.*, 2000). Az itt ismertetett eredmények alapján a következő stratégia javasolható a specifikus, de a preferenciális amplifikációt minimalizáló PCR profil kialakítására: (i) PCR optimalizálása a lehető legalacsonyabb annealációs hőmérsékletre ahol még nem jelennek meg aspecifikus termékek (a ciklusszám ekkor még lehet magas). (ii) A ciklusszám csökkentése körülbelül 25 ciklusra. Alacsony hozamok esetén párhuzamos PCR reakciók összeöntésével, egybetisztításával nyerhetünk kellő mennyiségű és koncentrációjú mintát a további vizsgálati lépésekhez.

3. A klónkönyvtár analízis közösség szerkezet torzító hatásai

3.1. Preferenciális ligáció nagy hosszheterogenitás esetén

A klónkönyvtár készítés közösség szerkezet torzító hatásait tisztított PCR termékekből összeállított modellközösségek segítségével vizsgáltuk. Olyan inzertek előállítására törekedtünk, melyek az inzertálódás hatékonyságát esetleg befolyásoló paramétereikben (GC arány, azonos végen levő primerek 5' nukleotidja) megegyeznek, kivéve a hosszukat, amelyet egy 16S-23S spacer klónkönyvtár mérettartományához igazítottunk (lásd 3. táblázat). Az inzertek elkészítéséhez univerzális eubakteriális primerek közül választottunk ki megfelelőket kötési hely és 5' nukleotid alapján.

Inzert jele	Hossza	GC aránya	Készítéséhez használt PCR primerek
AH1365	1365 bp	55,5%	63f: 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' 1387r: 5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3'
BC322	322 bp	55,0%	63f: 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' 338r: 5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'

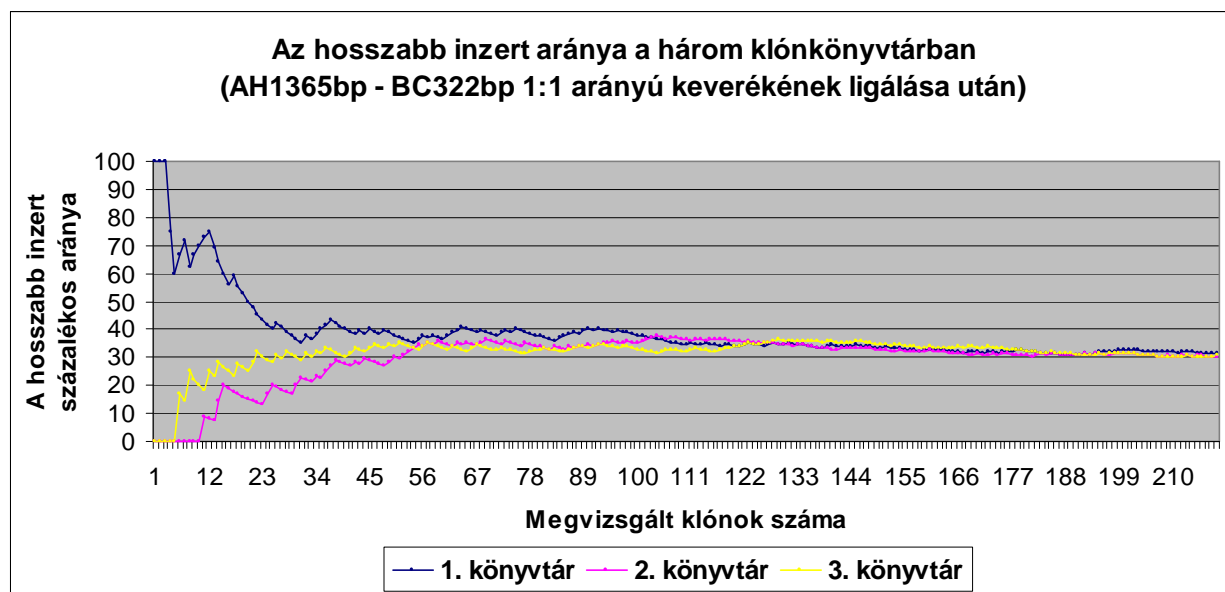
3. táblázat. Az első modellrendszerben használt inzertek tulajdonságai

Az 1:1 arányú PCR termék keverékek ligálásával és tarnszformálásával kapott könyvtárak inzert arányait a 5. ábra mutatja a feldolgozott klónok mennyiségének

függvényében. A három független kísérlet igen konzekvens eredményt mutatott, a hosszabb inzert aránya a beállított 50%-hoz képest rendre 31,39%, 30,14% illetve 30,84% lett, (átlag: 30,79%, szórás: 0,65%).

A kísérletekben megvizsgált klónok nagy számát az indokolja, hogy a szakirodalomban klónkönyvtárak reprodukálhatóságára igen kevés utalást találni, így próbáltuk a mintaszámot eleinte bőven túlméretezni. A három könyvtár kis szórása azt feltételezi, hogy a DNS kvantizálás mérési hibája, és az inzertkeverék összeállítás pipettázási hibája szintén alacsony mértékű (kisebb mint 1%).

Az eredmények alapján feltételezhetjük, hogy nagy hosszbeli heterogenitású génszakaszokra alapozott közösségszerkezeti vizsgálatok erősen torzított képet adhatnak a közösségalkotók mennyiségi viszonyairól.



5.ábra. A hosszabb inzert aránya könyvtáranként 219 klón megvizsgálása után a három könyvtár átlagaként 30,79% lett, 0,65% szórással. Az eredeti 50%-os aránytól való eltérés a rövidebb inzert preferenciális ligációját bizonyítja.

3.2. Inzert hosszától független preferenciális ligáció

Ebben az esetben az inzertek mind GC arányukban, mind a végükön elhelyezkedő nukleotidokban, valamint hosszukban is nagyon hasonlóak voltak, egyedül származásuk különbözött (lásd 4.táblázat).

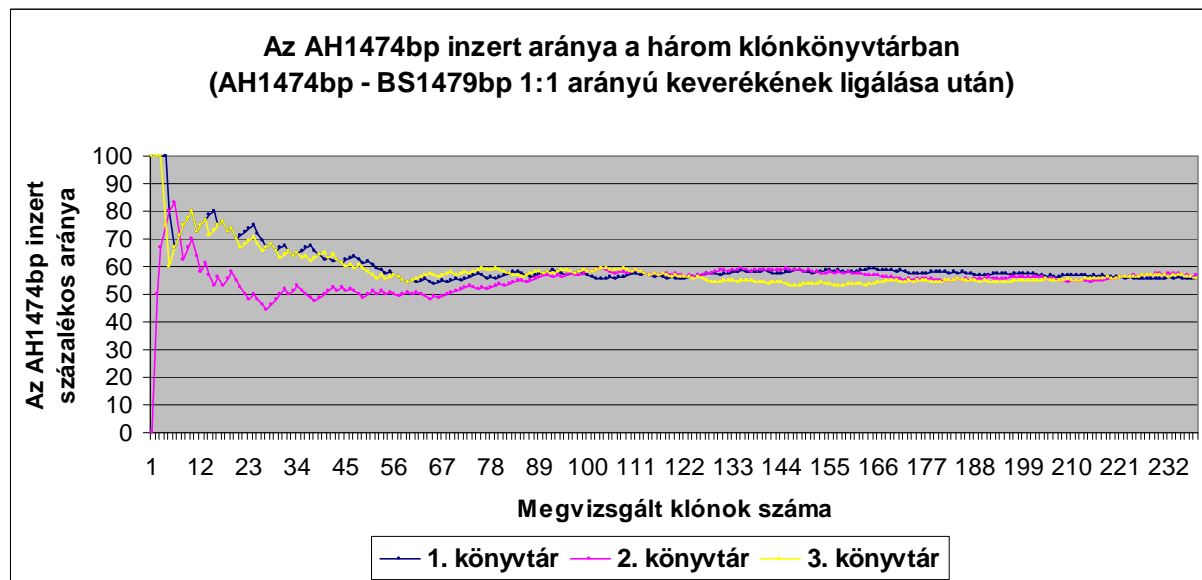
Inzert jele	Hossza	GC aránya	Készítéséhez használt PCR primerek
AH1474	1474 bp	55,2%	63f: 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' 1492r: 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'
BS1479	1479 bp	54,9%	63f: 5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3' 1492r: 5'-TACGGYTACCTTGTACGACTT-3'

4. táblázat. A második modellrendszerben használt inzertek tulajdonságai

Az AH1474 inzert aránya könyvtáranként 238 klón megvizsgálása után a várt 50% helyett rendre 55,46%, 56,66%, illetve 56,14% lett (átlag: 56,08%, szórás: 0,6%).

A várt aránytól való eltérés oka feltehetőleg az inzertek natív szerkezetének különbségében keresendő. A ligáló reakció elegyében mindkét inzert duplaszálú DNS-e

felvesz valamilyen, a szekvenciájától függő konformációt, s a ligálandó végek az egyik inzert esetében esetleg jobban hozzáférhetőek a ligáz számára. Mivel jelen esetben egy igen konzervatív génszakasszal dolgoztunk (16SrDNS), az inzertek szekvenciakülönbsége csekélyebb lehetett mint mondjuk spacer régiók, vagy kevésbé konzervatív bázissorrendű funkciógének esetében. A szekvenciakülönbségből adódó aránytorzulás funkciógén vagy spacer klónkönyvtárak esetében még erőteljesebben befolyásolhatja az eredményt.



6.ábra. Az AH1474b inzert aránya könyvtáranként 238 klón megvizsgálása után a három könyvtár átlagaként 56,08% lett, 0,6% szórással. Az eredeti 50%-os aránytól jelentős eltérést nem tapasztaltunk.

3.3. Konklúziók

Az eredmények alapján feltételezhetjük, hogy nagy hosszbeli heterogenitású génszakaszokra vagy spacer régiókra épülő klónkönyvtáras vizsgálatoknál a rövidebb, s így nagyobb valószínűséggel ligálódó inzertet adó fajok a végső közösség szerkezetében túlréprezentáltak lesznek, valószínűleg képet adva ezzel a dominanciaviszonyokról. A vizsgált gének szekvenciakülönbségeiből adódó eltérő hatékonyságú inzertálódás kisebb mértékben ugyan, de szintén befolyásolhatja a detektálható fajkompozíciót.

4. Tenyésztés optimalizációs kísérletek

A modellrendszer elemzésével kapott eredmények használhatóságát természetesen teszteltük környezeti minták elemzésével. Ezek egyike a keskenylevelű gyékény rizoplán mikrobiotájának vizsgálata volt, azonban a kutatásokat kiterjesztettük a szikes vizek diverzitás elemzésére is. Mindkét esetben környezeti klónok (eleddig ismeretlen szervezetek) sokaságát találtuk, amelyek közül igyekeztünk olyanokat tenyésztésre kijelölni, amelyek az adott környezetben dominánsnak tűnnek, valamint filogenetikai távolságuk a legközelebbi rokon fajoktól legalább 8% feletti. A tenyésztésnél az eredményesség tesztelésére segítségül hívtunk molekuláris ujjlenyomat módszereket is (DGGE, T-RFLP). Az első mintegy 12 faj izolálása 2006-ban megtörtént, mind Bacteria, mind pedig Archaea doménba tartozó szervezetek vannak köztük. A fajleírások legnagyobb részét megtörténtek (fenetikai bélyegek, genetikai bélyegek elemzése), azonban a kemotaxonomiai markerek meghatározása még nem történt meg. Ennek oka az, hogy mind a kinon, mind a zsírsav elemzésekhez jeles biomasszára van

szükség (10-20 g nedves tömeg) és ezt nem tudtuk előállítani. A probléma megoldására táptalaj optimalizációt végzünk. A fajleírások a 2007. év feladatát jelentik.

5. Irodalomjegyzék

- Baker GC, Smith JJ & Cowan DA (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Meth* 55: 541-555.
- Forney LJ, Zhou X & Brown CJ (2004) Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Curr Opin Microbiol* 7: 210-220.
- Hansen MC, Tolker-Nielsen T, Givskov M & Molin S (1998) Biased 16S rDNA PCR amplification caused by interference from DNA flanking the template region. *FEMS Microbiol Ecol* 26: 141-149.
- Jensen MA & Straus N (1993) Effect of PCR conditions on the formation of heteroduplex and single-stranded-DNA products in the amplification of bacterial ribosomal DNA spacer regions. *PCR Meth Appl* 3: 186-194.
- Lane DJ (1991) 16S/23S rRNA sequencing, (Stackebrandt E & Goodfellow M, eds.), pp. 115-147. Wiley, New York.
- Loisel P, Harmand J, Zemb O, Latrille E, Lobry C, Delgenes JP & Godon JJ (2006) Denaturing gradient electrophoresis (DGE) and single-strand conformation polymorphism (SSCP) molecular fingerprintings revisited by simulation and used as a tool to measure microbial diversity. *Environ Microbiol* 8: 720-731.
- Lueders T & Friedrich MW (2003) Evaluation of PCR amplification bias by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of small-subunit rRNA and *mcrA* genes by using defined template mixtures of methanogenic pure cultures and soil DNA extracts. *Appl Environ Microbiol* 69: 320-326.
- Marchesi JR, Sato T, Weightman AJ, Martin TA, Fry JC, Hiom SJ, Dymock D & Wade WG (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 64: 795-799.
- Osborn AM, Moore ERB & Timmis KN (2000) An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environ Microbiol* 2: 39-50.
- Polz MF & Cavanaugh CM (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* 64: 3724-3730.
- Qiu XY, Wu LY, Huang HS, McDonel PE, Palumbo AV, Tiedje JM & Zhou JZ (2001) Evaluation of PCR-generated chimeras: Mutations, and heteroduplexes with 16S rRNA gene-based cloning. *Appl Environ Microbiol* 67: 880-887.
- Reysenbach AL, Giver LJ, Wickham GS & Pace NR (1992) Differential amplification of ribosomal-RNA genes by polymerase chain-reaction. *Appl Environ Microbiol* 58: 3417-3418.
- Saikaly PE, Stroot PG & Oerther DB (2005) Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 71: 5814-5822.
- Simpson JM, McCracken VJ, Gaskins HR & Mackie RI (2000) Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA amplicons to monitor changes in fecal bacterial populations of weaning pigs after introduction of *Lactobacillus reuteri* strain MM53. *Appl Environ Microbiol* 66: 4705-4714.
- Wang GCY & Wang Y (1997) Frequency of formation of chimeric molecules is a consequence of PCR coamplification of 16S rRNA genes from mixed bacterial genomes. *Appl Environ Microbiol* 63: 4645-4650.